

L3 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN
AN 1990-186834 [25] WPIDS Full-text
ED 20050501
DNC C1990-080967 [21]
TI Solubilisation of somatotropin inclusion bodies - in aqueous alkaline medium to give high yields of prod. without using chaotropic agents
DC B04; D16
IN FROST R A; MCCOY K M
PA (AMCY-C) AMERICAN CYANAMID CO
CYC 25
PI EP 373325 A 19900620 (199025)* EN 12[0]
AU 8946750 A 19900621 (199031) EN
PT 92305 A 19900629 (199031) PT
CA 2005478 A 19900616 (199035) EN
HU 52563 T 19900730 (199035) HU
DK 8906390 A 19900617 (199036) DA
FI 8906021 A 19900617 (199040) FI
JP 02222697 A 19900905 (199042) JA
ZA 8909626 A 19900926 (199044) EN
US 5064943 A 19911112 (199148) EN 11 C07K003-12
<--
NZ 231681 A 19930927 (199341) EN C07K003-08
IL 92135 A 19950526 (199536) EN C07K001-14
EP 373325 B1 19960403 (199618) EN 12[7] C07K014-61
DE 68926153 E 19960509 (199624) DE C07K014-61
ES 2087065 T3 19960716 (199635) ES C07K014-61
IE 74848 B 19970813 (199745) EN C07K007-26
HU 213572 B 19970828 (199811) HU C12P021-00
FI 102179 B1 19981030 (199849) FI C07K001-14
KR 148681 B1 19980801 (200020) KO C12N009-00
CA 2005478 C 20000104 (200022) EN C07K014-61
DK 174662 B 20030818 (200361) DA C07K014-61
ADT EP 373325 A EP 1989-119409 19891019; US 5064943 A US 1988-285477
19881216; DE 68926153 E DE 1989-68926153 19891019; EP 373325 B1
EP 1989-119409 19891019; DE 68926153 E EP 1989-119409 19891019; ES
2087065 T3 EP 1989-119409 19891019; IL 92135 A IL 1989-92135 19891027;
IE 74848 B IE 1989-3561 19891106; NZ 231681 A NZ 1989-231681 19891208;
CA 2005478 C CA 1989-2005478 19891214; JP 02222697 A JP 1989-322768
19891214; DK 174662 B DK 1989-6390 19891215; FI 102179 B1 FI 1989-6021
19891215; HU 213572 B HU 1989-6639 19891215; KR 148681 B1 KR
1989-18683 19891215; ZA 8909626 A ZA 1989-9626 19891215
FDT DK 174662 B Previous Publ DK 8906390 A; DE 68926153 E Based on EP
373325 A; ES 2087065 T3 Based on EP 373325 A; FI 102179 B1 Previous
Publ FI 8906021 A; HU 213572 B Previous Publ HU 52563 T
PRAI US 1988-285477 19881216
AB EP 373325 A UPAB: 20050501
Solubilisation and naturation of somatotropin is effected by dispersing
somatotropin refractile bodies in H2O and adjusting the pH to 11.5-12.5.
ADVANTAGE - The process gives high yields of properly natrated somatotropin
without the need to use chaotropic agents or any renaturation treatment.

ABEQ (0010)
US 5064943 A UPAB 20050501
Solubilisation and naturation of recombinantly derived somatotrophin
(I) comprises (a) dispersing refractile bodies of (I) in water to give

a concn. of 5 g/l. (b) adjusting pH to 11.5-12.5, (c) maintaining this pH for 2-20 mins. to solubilise (d) readjusting the pH to 11-12, (e) maintaining the soln. at the readjusted pH for 5-12 hours to effect naturation. All stages are carried out in the absence of chaotropic and denaturing agents. (I) can be animal growth hormones, derivs., analogues, variants and fragments and is pref. bovine or porcine somatotrophin.

ADVANTAGE - Good yields of monomeric (I) are obtd. with lower dimer formation. - (11pp)

*** end of records ***

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-222697

⑬ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月5日

C 12 P 21/02
C 07 K 3/00
13/00H
ZNA8214-4B
8318-4H
8318-4H

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全8頁)

⑮ 発明の名称 ソマトトロピンの可溶化及び熟成法

⑯ 特 願 平1-322768

⑰ 出 願 平1(1989)12月14日

優先権主張 ⑱1988年12月16日 ⑲米国(US) ⑳285477

㉑ 発 明 者 ケビン・マイケル・マ アメリカ合衆国ニュージャージー州07030ホボケン・ガーデンストリート 921
ツコイ

㉒ 発 明 者 ロバート・エイ・フロ アメリカ合衆国ニューヨーク州10710ヨンカーズ・ベッドフォードブレイス 10

㉓ 出 願 人 アメリカン・サイアナ アメリカ合衆国ニュージャージー州07470ウエイン・ワンミド・カンパニー サイアナミドブラザ(番地なし)

㉔ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉

明 細 書

1. 発明の名称

ソマトトロピンの可溶化及び熟成法

2. 特許請求の範囲

1. ソマトトロピンの可溶化及び熟成法であつて、

(a) ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、

(b) pHを約11.5ないし12.5の範囲に調整し、

(c) 同pH範囲を不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、

(d) 得られた溶液のpHを約11ないし12の範囲に再調整し、そして

(e) 得られた溶液を再調整したpH範囲に十分な時間維持して、溶液中のソマトトロピンが収率で適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにする

ことを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

2. ソマトトロピンの可溶化及び熟成法であつて、

(a) ソマトトロピン不応体を水中に適当な濃度で分散し、

(b) pHを約11.5ないし約12.5の範囲に調整し、そして

(c) 同pH範囲を十分な時間維持して、溶液中のソマトトロピンが収率で、適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにすることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

3. ソマトトロピンの可溶化及び熟成法において、

(a) ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、

(b) 不応体の水中pHを、可溶化を引き起こす水準に調整し、

(c) 同pHを、不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、

(d) 同溶液のpHを、熟成化を引き起こす水準

に再調整し、そして

(e)同溶液を再調整したpHで十分な時間保持し、溶液中のソマトトロピンが、収収率で適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにする

ことを特徴とするソマトトロピン可溶化及び熟成法。

4. 特許請求の範囲第1項記載の方法によって製造されたモノマー状ソマトトロピン。

3. 発明の詳細な説明

発明の背景

近年、DNA組み換え技術によって、蛋白質の大規模生産が可能になった。ソマトトロピン蛋白質の可溶化及び熟成法については、その幾つかが米国特許の主題となっている。例えば、米国特許(U.S. Patent)第4,511,503は、不応体(refractile bodies)から蛋白質回収の典型的な方式を示したものである。不応体は、大腸菌(E. Coli)細胞の細胞質中に分布し、位相差顕微鏡下で明るい点として見え、凝集変性したソマトトロピンの不溶

硫酸ナトリウムは非常に効果的な変性剤であり、グアニジン塩酸塩よりもはるかに安価であるが、同化合物は、変性した蛋白質とはるかに強固に結合して問題の蛋白質から完全に分離してしまい、同時に加工費を増大させる。尿素が普通弱い変性剤又はカオトロピック剤として使用される。しかし尿素を使用する方法でも、例えば最終製品の汚染、そして取り扱い、貯蔵及び廃棄物処理などの問題を有する。

その他の従来法の問題に加えて、正しく変性したモノマー体は単一製品ではない。ソマトトロピンモノマーは、ソマトトロピンの性質及び生物学的活性の全てを有する最小単位である。典型的なソマトトロピンモノマーは、約191のアミノ酸残基からなり、分子量は大体22,000 daltonsである。同モノマー分子はその他の同様な分子と共有的に結合しておらず、又非共有的に会合もしていない。

ソマトトロピンダイマーは、共有的に、例えば分子間ジスルフィド結合によって結合しているか、又は非共有的に互いに会合している2個のモノマ

性粒子である。同不応体は大腸菌プラスミドDNAの遺伝子操作によって、ソマトトロピンが過剰生産されると生ずる。不応体は、強力な変性剤(denaturant)又はカオトロピック(chaotropic)剤で処理することにより、不規則に折り畳まれていた分子が引き伸ばされ、溶解性になる。こうして得られた蛋白質は再変性(renatured)しなければならない。不応体はこの分子鎖引き伸ばし、再折り畳み処理を行わないと、不応体が生物学的に不活性であるために、使用することが出来ない。この方式で最も普通に使用される強力変性剤はグアニジン塩酸塩であった。

その他の方法では、その他のカオトロピック剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムを使用したり(例えば米国特許第4,677,196号)、又は弱い変性剤例えば尿素を使用する(米国特許第4,731,440号)。

これらの方法でソマトトロピンを可溶化、変性する場合、それぞれ問題がある。グアニジン塩酸塩は非常に高価であり、変性工程を実施するには、他の試薬と置き換えなければならない。ドデシル

一分子からなる。ダイマー分子は、モノマー分子の倍の数のアミノ酸残基数からなり、分子量はモノマー分子の倍である。

従来法を使用するとあいにく、ダイマーがいくらか生成すると同時に、より高分子量の蛋白分子が生成する。生物学的に有用なのはモノマーだけであって、ダイマーではない。

従って、技術的に要求されるものは、ソマトトロピンモノマーを高収率で、過剰なダイマーを生成させずに、又カオトロピック剤を使用せずに、製造する、商業的に実行可能なソマトトロピン可溶化及び熟成法である。

本発明を要約すれば、アルカリ水溶液を使用して低分子量のダイマーを形成させ、そして変性剤の使用、又再熟成工程、更に再熟成剤の使用を不要にしたソマトトロピン可溶化及び熟成法である。

発明の要約

カオトロピック剤を使用しないソマトトロピンの可溶化及び熟成法と、同方法によって製造されたモノマー状ソマトトロピンを開示する。同方法

は、ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、pHを約11.5ないし12.5の範囲に調整し、同pH範囲を不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、随時、得られた溶液のpHを約11ないし12の範囲に再調整し、そして得られた溶液を再調整したpH範囲に十分な時間維持して、溶液中のソマトトロピンが、高収率で適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにすることからなる、ソマトトロピンの可溶化及び熟成法である。

驚くべきことに、本発明は低度のダイマーを形成するので、再熟成段階を別に設けたり、あるいは再熟成剤を使用したりする必要がなくなった。

発明の詳細な説明

本発明は、ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、同不応体の水中pHを可溶化を行う水準に調整し、同pH範囲を不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、随時、得られた溶液のpHを熟成を行う水準に再調整し、そして得ら

他のいかなる型のソマトトロピンも利用することができる。

新規な方法の第1段階では、ソマトトロピン不応体を水(好ましくは脱イオン水)中に、適当な濃度で分散する。全蛋白質の濃度は、本発明の重要な因子である。第1図が示すように、モノマー収率は、同蛋白質の全濃度に依存する。適当な濃度は約5.0 g/l以下、好ましくは0.5 g/lないし約5.0 g/lの範囲である。特に好ましくは約2.5 g/lの濃度である。濃度が約5.0 g/l以上に増加すると、結果が悪くなる傾向がある。たとえ溶液濃度が約0.5 g/l以下で、モノマー収率に関しては良い結果が得られるようであっても、このような希薄溶液を使用するのは、商業的な面で、例えば貯蔵及び資本経費が過剰にかかり、装置が大きくなり、更に過剰な液体を除去する工程で、量が多いために操作段階を普通より多くせねばならず有利ではない。

ソマトトロピン濃縮液のpHは約11.5ないし12.5に、好ましくは約12.0ないし12.2に調整し、ソ

マトトロピンを水中に可溶化する。どの強塩基も、ソマトトロピン溶液のpHを調整するのに使用することができる(例えば水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムを添加する)。この可溶化は一般に比較的短時間で、典型的には約2ないし20分で起こる。同範囲のpHで不応体は目に見えて溶解し、得られた溶液は透明である。ソマトトロピン不応体が溶解してから、同pHは維持することもできるし、又は下げることでもできる。もし維持されれば、ソマトトロピンは徐々に折り畳まれ、適正に(properly)熟成されたモノマーを生ずる。変性剤を使用しないので、再熟成("renaturing")段階が不要になる。その代わり、アルカリ性環境にして、熟成型の環境下に可溶化を行う。熟成環境とは、ソマトトロピンに本来の分子立体配座を取らせるようにする物理的及び溶剤の条件を意味する。ソマトトロピンが生物活性を発揮するのに必要な適正な酸化状態を達成し、分子立体配座を取るには、同分子を熟成環境に置かなければならない。熟成型の環境である為に、可溶化した不応体は徐々に

本発明で、ソマトトロピンの用語は、(1)あらゆる種の、例えばヒト、ウシあるいはブタの動物成長ホルモン、その誘導体、同族体、(2)成長インスリンの前駆体、例えば還元(-SH)成長ホルモン、及びS-保護成長ホルモン、例えば成長ホルモンS-スルホネート、(3)成長ホルモン、又はその前駆体の変種、例えば成長ホルモンアミノ酸配列を延長及び/又は短縮して改質した構造体、例えばヒト成長ホルモンの20K変種体、メチオニル化ヒト成長ホルモン、 $\Delta 7$ 及び $\Delta 9$ ブタ成長ホルモン等、及び(4)成長ホルモン又はその前駆体の同族体、例えば成長ホルモンアミノ酸配列を、1個又はそれ以上のアミノ酸残基で置換改質した構造体を示す。本発明では、組み替え誘導したソマトトロピン、天然産ソマトトロピン並びにその

マトトロピンを水中に可溶化する。どの強塩基も、ソマトトロピン溶液のpHを調整するのに使用することができる(例えば水酸化ナトリウム又は水酸化カリウムを添加する)。この可溶化は一般に比較的短時間で、典型的には約2ないし20分で起こる。同範囲のpHで不応体は目に見えて溶解し、得られた溶液は透明である。ソマトトロピン不応体が溶解してから、同pHは維持することもできるし、又は下げることでもできる。もし維持されれば、ソマトトロピンは徐々に折り畳まれ、適正に(properly)熟成されたモノマーを生ずる。変性剤を使用しないので、再熟成("renaturing")段階が不要になる。その代わり、アルカリ性環境にして、熟成型の環境下に可溶化を行う。熟成環境とは、ソマトトロピンに本来の分子立体配座を取らせるようにする物理的及び溶剤の条件を意味する。ソマトトロピンが生物活性を発揮するのに必要な適正な酸化状態を達成し、分子立体配座を取るには、同分子を熟成環境に置かなければならない。熟成型の環境である為に、可溶化した不応体は徐々に

折り畳まれ、適正に熟成したモノマーの希望の最終製品を形成する。このことは、変性剤を使用し、変性後、再熟成を必要とする従来技術とは著しい対照を為す。

ソマトトロピン不応体を溶解してから、pHは約11ないし約12の範囲に再調整できる。pHを低くすると熟成速度が増加する。pHは任意の方法、例えば磷酸を添加して低くすることができる。再調整範囲は好ましくは約pH11.3ないし11.7であり、ダイマー生成を最小にする。特に好ましくはpH11.5である。驚くべきことに、pHを好ましい範囲に下げると、ダイマーが減少し、大量のモノマーが形成されることが発見された。pHを再調整することによってダイマー生成が減少、そしてモノマー生成が増大することは、生成するダイマー又はモノマーの割合を同じに維持することが期待できることになり、驚くべきことである。第2図は、本発明の好ましいpH範囲を使用することによって、ダイマー生成が減少した思いがけない結果を示したものである。

予量が変わらずに（又は増大しながら）モノマー体が正しく畳み込まれるか、又は他の蛋白質と接合するとするとしたモデルではなく、高分子量蛋白質集合体からモノマー体が生成するモデルに合っていることを示していることに注目されたい。

第3図は5分間後のゲル透過クロマトグラフィ（gpc）の結果を示したものである。3つのピーク、即ち、横軸0.45体積単位のピークA、約0.65体積単位のピークB1及び約0.77体積単位のピークB2が同定できる。ピークAは、分子量が1,000,000daltons以上の蛋白質様不純物からなる。ピークB1は蛋白質様不純物、例えばホストの大腸菌からの混入物を少し含むソマトトロピン集合体からなる。ピークB2はモノマー状ソマトトロピンである（ピークB2にも又モノマー以外に不純物が残っている可能性がある）。

第4図は、1時間後のgpcの結果を示したものである。ピークA及びピークB1の両者は小さくなり、ピークB2が著しく大きくなっている。

第5図は2時間後のgpcの結果を示したもので

約11のpHよりも低いpHを使用することもある。しかし、一般に収率に悪影響がでて、ダイマー生成が増大する。更にpHを大きく下げると、ソマトトロピンが溶液から沈殿する危険性がある。反対にpHを再調整しないと、熟成工程の時間が長くなり、分解反応、例えば脱アミド化などが起こってくる。しかし、ソマトトロピンの型が異なれば（例えば、成長ホルモンの異なる同族体、誘導体、前駆体、又は変種）、pH範囲は当然異なってくる可能性があり、このような変化は本発明の範囲に含まれると考えられる。

溶液は、再調整pH範囲で、温度を約20ないし30℃にして約5ないし12時間（好ましくは約10時間）、モノマー量が最大値に達するまで保持する。最大値に達したかどうかはゲル透過クロマトグラフィで決定する。第3ないし第7図は、本発明の方法を用いた際、蛋白質が時間と共に変化する様子を示したものである。第3ないし第7図はモノマー生成経路が、従来から提案されている、変性剤を使用によってモノマー体が直ちに生成し、分

である。ピークA及びピークB1は更に小さくなり、ピークB2は更に大きくなっている。

第8図は5時間後のgpc結果を示したものである。約0.7体積単位に小さな第4番目のピーク又は肩が現れたことに注目されたい。この肩はダイマーが生成したことを示している。第6図のこの肩は、本発明の新規な方法ではダイマー生成が少ないことを示している。大量のダイマーが生成する方法では、独立してはっきりしたピークが明確に現れる。

第7図は、10時間後のgpc結果を示したものである。第6図から少ししか変わっていないが、モノマーを喪失するピークB2は僅かに増加している。

第3ないし第7図は、本発明が熟成環境を創出したことを示している。変性剤を使用せず、そして再成熟段階を特に設けず、又再成熟剤も使用しなくとも、不応体中の蛋白分子がほぐれて正しく折り畳まれ、生物学的に活性なモノマー状ソマトトロピンを生成する。

得られた溶液は、適正に熟成されたモノマー状

ソマトトロピンを収率で含む。収率とは、溶解全蛋白質の約30%ないし約45%、又はそれ以上を意味する。全蛋白質には、あらゆる形のソマトトロピン並びにそれ以外の全ての非ソマトトロピン蛋白質不純物、例えば宿主大腸菌からの夾雑物が含まれる。従って、ソマトトロピンだけを基準として計算すると、収率ははるかに高いものとなる。カオトロピック剤を使用した方法の収率はほぼ同じである。しかし、本発明はカオトロピック剤を使用しないので、えられるモノマー状ソマトトロピンは、有害な汚染剤、例えばSDS、グアニジン塩酸塩、又は尿素などは、痕跡量も含んでいない。本発明を更に下記実施例によって説明する。但し、本発明はこれらによって何等制限されるものではない。

実施例 1

ウシソマトトロピン

遺伝子操作した大腸菌細胞を発酵させてウシソマトトロピン包含体を生成させ、得られた発酵混合物を遠心分離にかけ、液状媒体(broth)から

ニオン交換体にかける。平衡バッファー溶液で洗浄後、b S Tは100 mM NaCl、10 mMホー酸塩溶液を使用して、pH 9で解出させた。b S Tピークを濃縮、Amicon HPI100-43 中空繊維カートリッジを使用して、稀アンモニア溶液で、透過液の電気伝導度が約100 microsiemens/cmになるまで脱塩した。濃度が約2 g/lの脱塩溶液を凍結乾燥し、確立された生物及び化学試験をパスするウシソマトトロピンを得た。

実施例 2

ブタソマトトロピン

遺伝子操作した大腸菌細胞を発酵させてブタソマトトロピン包含体を生成させ、得られた発酵混合物を遠心分離にかけ、液状媒体(broth)から細胞を分離する。細胞はもう1度スラリーにし、8,000 psigの圧力下にGaulinホモジナイザーに2回通して粉碎する。懸濁液を遠心分離し、得られたペレットをもう1度スラリーにし、37℃の温度で、リゾチームとTriton X-100洗浄剤を使用して処理する。得られた懸濁液を遠心分離し、ペレ

ットを分離する。細胞はもう1度スラリーにし、8,000 psigの圧力下にGaulinホモジナイザーに2回通して粉碎する。懸濁液を遠心分離し、得られたペレットをもう1度スラリーにし、37℃の温度で、リゾチームとTriton X-100洗浄剤を使用して処理する。得られた懸濁液を遠心分離し、ペレットは2回水洗し、洗浄毎に遠心分離する。得られたペレットは不溶性変性ウシソマトトロピンを含んでおり、それを水に加え、そしてNaOHでpHを12.15に調整、合計蛋白質濃度を約2.5 g/lにする。pH 12.15そして25℃で20分間置いてから、得られた透明溶液をpHを11.5に調整、8時間維持した。溶液を、Amicon HPI100-43 分子量100K dalton以下を遮断する中空繊維カートリッジで限外濾過する。得られた透過液はAmicon HPI100-43 分子量100K dalton 遮断中空繊維カートリッジを使用して濃縮し、約5 g/lとする。濃縮溶液は1 N HClでpH 9に調整、樹脂1 g当たり20 g b S Tの割合で、10 mMホー酸塩(pH 9)で平衡させたDEAE-Sepharose FAST FLOWア

トは2回水洗し、洗浄毎に遠心分離する。得られたペレットは不溶性ブタソマトトロピンを含んでおり、それを水に加え、蛋白質総濃度を約2.5 g/lにする。得られたスラリーを良く混合ながら、5 N NaOHを添加、pHを12.2に上げる。得られた溶液は、5分以上かかってゆっくりと透明になる。溶液は、20℃で20分間置いて熟成する。1 M硝酸でpHを11.5に下げ、10時間熟成した。ゲル透過クロマトグラフィーで測定したところ、熟成の終点で、1.05 g/lであった。

当技術分野の通常の熟達者ならば、本発明に対して、多くの変法を可能にできるが、それらは先に述べた特許請求の範囲の中にあると理解されたい。

本発明の主なる特徴及び態様は下記のようなる。

1. ソマトトロピンの可溶性及び熟成法において、
 - (a) ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、
 - (b) pHを約11.5ないし12.5の範囲に調整し、

(c)同pH範囲を不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、

(d)得られた溶液のpHを約11ないし12の範囲に再調整し、そして

(e)得られた溶液を再調整したpH範囲に十分な時間維持して、溶液中のソマトトロピンが、高収率で適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにする

ことからなることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

2. 上記第1項において、ダイマー生成が減少することを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

3. 上記第1項において、該ソマトトロピンがウシ又はブタソマトトロピンであることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

4. 上記第1項において、該ソマトトロピンが遺伝子組み換えによって誘導されたソマトトロピンであることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

(a)ソマトトロピン不応体を水中に分散し、

(b)pHを約11.5ないし12.5の範囲に調整し、そして

(c)同pH範囲を十分な時間維持して、溶液中のソマトトロピンが高収率で、適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにすることからなることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

11. 上記第10項において、濃度が約5 g/l以下であることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

12. 上記第10項において、pHが約12.0ないし12.2、濃度が約0.5ないし5 g/lであり、そして時間が、温度約20ないし30℃で、約5ないし12時間であることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

13. 上記第11項において、該ソマトトロピンがウシ又はブタソマトトロピンであることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

14. ソマトトロピンの可溶化及び熟成法において、

5. 上記第4項において、該ソマトトロピンがウシ又はブタソマトトロピンであることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

6. 上記第1項において、段階(b)のpHを約12.0ないし12.2の範囲に調整し、そして段階(d)ではpHを約11.3ないし11.7に再調整することを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

7. 上記第6項において、段階(a)の濃度が約5 g/l以下で、段階(c)の時間が約2分から20分間であり、そして段階(e)の時間が、温度約20ないし30℃で、約5ないし12時間であることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

8. 上記第7項において、段階(a)の濃度が約0.5ないし5 g/lであることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

9. 上記第8項において、段階(a)の濃度が約2.5 g/l、pHが段階(d)で11.5に再調整され、そして段階(e)の時間が約10時間であることを特徴とするソマトトロピンの可溶化及び熟成法。

10. ソマトトロピンの可溶化及び熟成法において、

(a)ソマトトロピン不応体を適当な濃度で水中に分散し、

(b)不応体の水中pHを、可溶化を引き起こす水準に調整し、

(c)同pHを、不応体を可溶化するのに十分な時間維持し、

(d)同溶液のpHを、熟成化を引き起こす水準に再調整し、そして

(e)同溶液を再調整したpHで十分な時間保持し、溶液中のソマトトロピンが、高収率で適正に熟成したモノマー状ソマトトロピンからなるようにする

ことからなることを特徴とするソマトトロピン可溶化及び熟成法。

15. 上記第1項記載の方法によって製造されたモノマー状ソマトトロピン。

16. 上記第8項記載の方法によって製造されたモノマー状ソマトトロピン。

17. 上記第10項記載の方法によって製造されたモノマー状ソマトトロピン。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、モノマー収率の、熟成pH及び蛋白質濃度への依存性を図式的に示したものである。

第2図は、生成するダイマーの量の、熟成pH及び蛋白質濃度への依存性を図式的に示したものである。

第3ないし第7図は、本発明の新規な方法によって得られた生成物のゲル透過クロマトグラフィーを時間の経過（それぞれ5分、1時間、2時間、5時間及び10時間）に従って示したものである。

特許出願人 アメリカン・ザイアナミド・カンパニー
代理人 井理士 小田島 平 吉



全蛋白質濃度及び熟成pHに対するモノマー生成

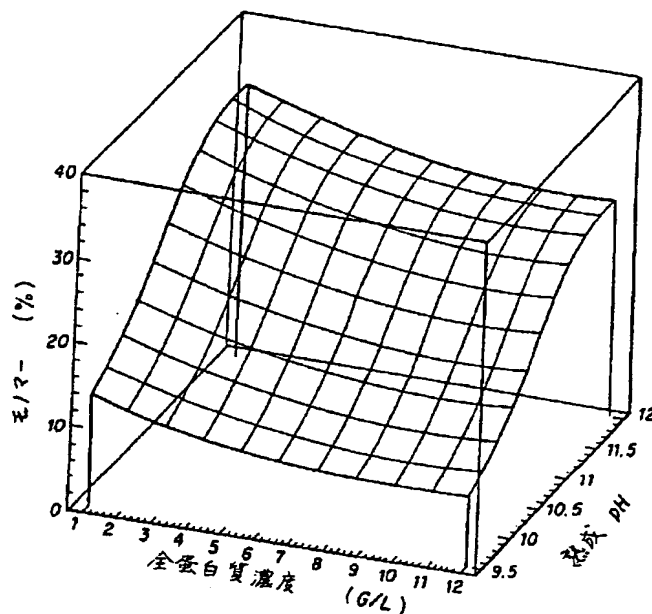


FIG. 1

全蛋白質濃度及び熟成pHに対する
溶解液中ダイマー比率

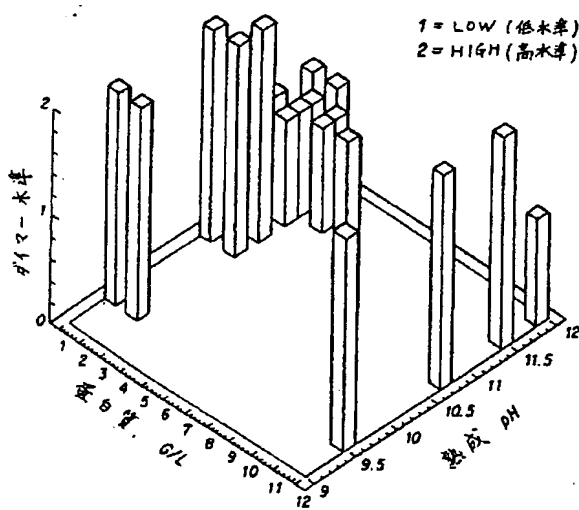


FIG. 2

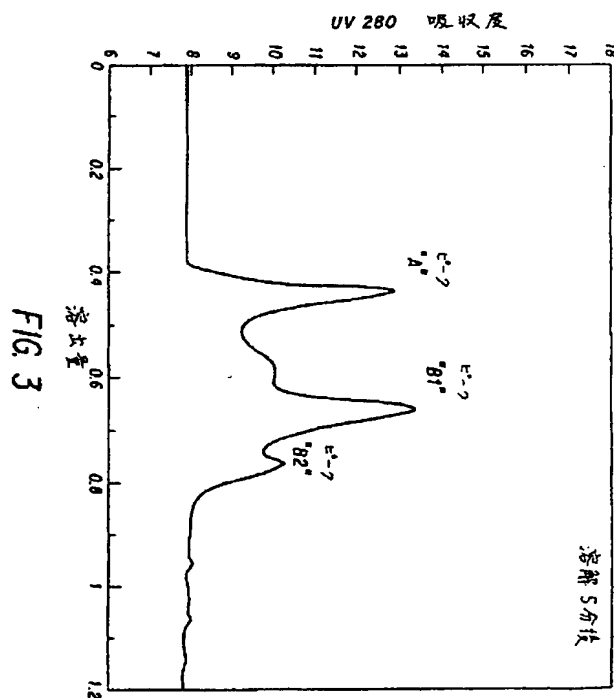
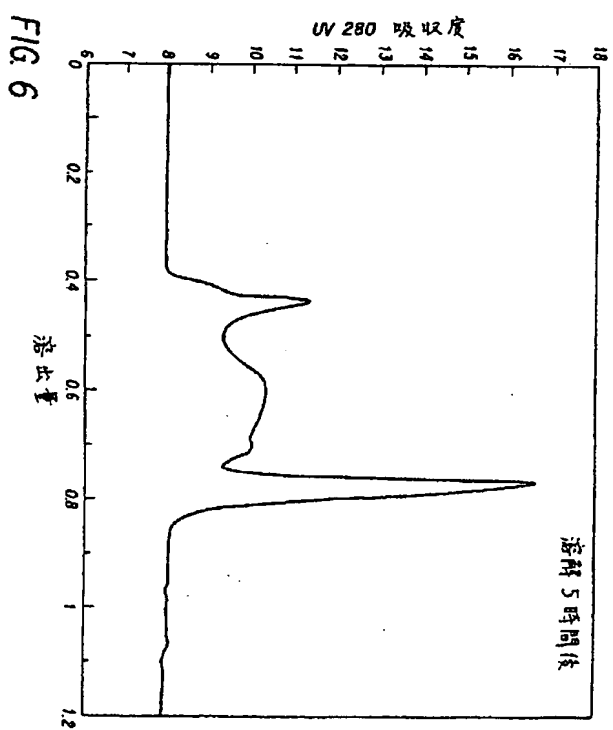
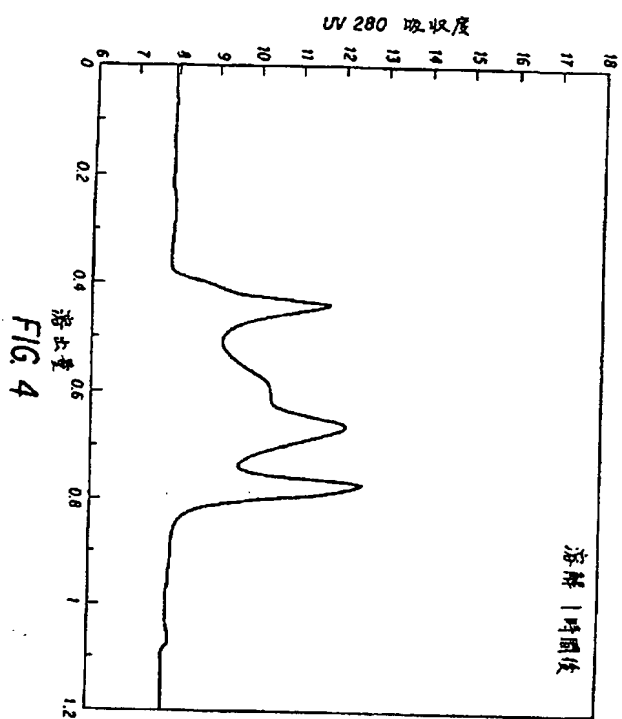
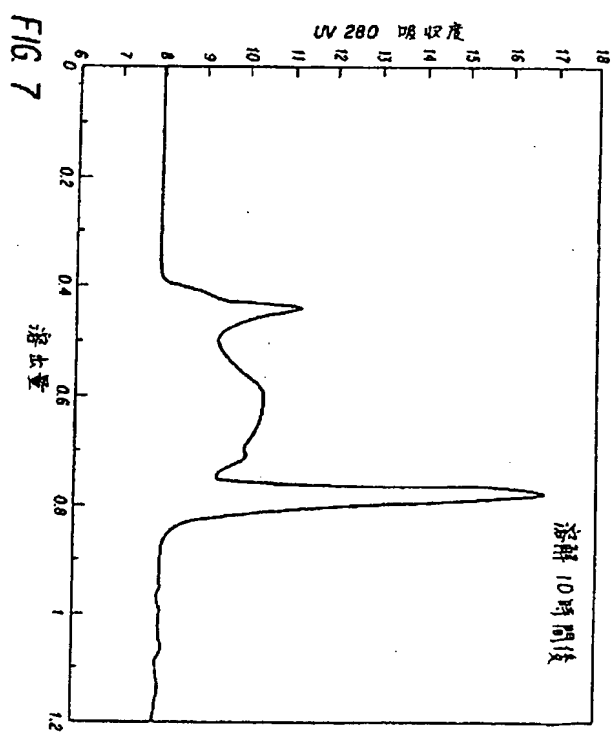
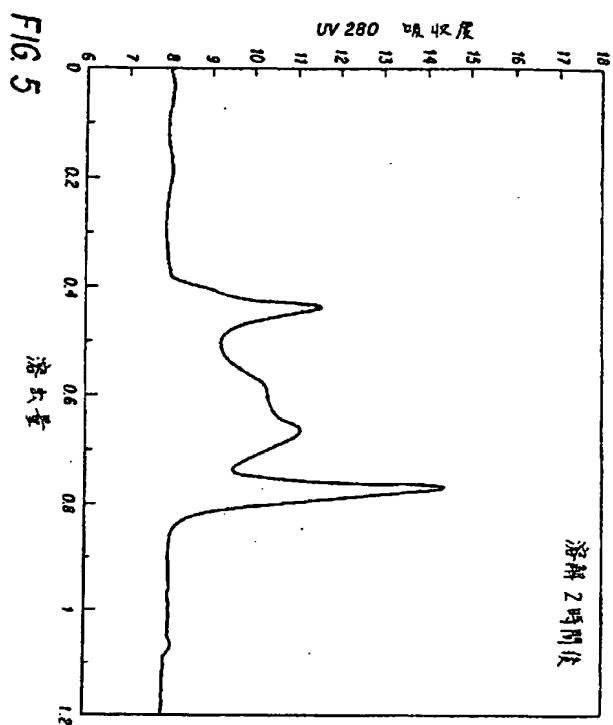


FIG. 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.